

9-26-05

R E P U B L I Q U E F R A N Ç A I S E

10/546139



IN/FR 2004/000354

27 FEV. 2004

REC'D 28 MAY 2004

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 29 JAN. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIÈGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 540 @ W / 030103

REMISE DES PIÈCES DATE 14 MAI 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0305769 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 14 MAI 2003		NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 FRANCE	
Vos références pour ce dossier (facultatif) 240569 D21227 FT			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° _____ Date _____ N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) MICROORGANISME A ACTIVITE CYSTEINE SYNTHASE MODIFIEE ET PROCEDE DE PREPARATION DE LA CYSTEINE.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		METABOLIC EXPLORER	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN		423703107	
Code APE-NAF			
Domicile ou siège		BIOPOLE CLERMONT-LIMAGNE 63360 SAINT BEAUZIRE, FR	
Rue			
Code postal et ville			
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

14 MAI 2003

LIEU


75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

0305769

DB 540 W / 030103

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		240569 D21227 FT	
Nom			
Prénom			
Cabinet ou Société		Cabinet REGIMBEAU	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	20, rue de Chazelles	
	Code postal et ville	75847 PARIS CEDEX 17	
	Pays		
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)		01 44 29 35 00	
Adresse électronique (facultatif)		01 44 29 35 99	
		info@regimbeau.fr	
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) 		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI M. ROCHET	

92-1001

Microorganisme à activité cystéine synthase modifiée et procédé de préparation de la cystéine

La présente invention se rapporte au domaine de la bioconversion et
5 d'obtention d'acides aminés par fermentation de microorganismes. Elle se rapporte à
une méthode de criblage et d'évolution dirigée permettant d'identifier une souche de
microorganisme, éventuellement génétiquement modifié, possédant une enzyme à
activité « cystéine synthase modifiée », en particulier une O-acyl-L-homosérine
sulfhydrolase modifiée, ladite souche produisant de la L-cystéine ou un acide aminé
10 dérivé par métabolisme d'une source de carbone simple. L'invention concerne
également la souche de microorganisme et un procédé de préparation de la L-
cystéine, ou acide aminé dérivé, par culture de ladite souche de microorganisme.

La cystéine peut-être produite en utilisant des moyens très variés et des
sources différentes. Ainsi Sun-Orient Chemical Co., Ltd., extrait la L-cystine à partir
15 des cheveux hydrolysés en présence d'HCl. La L-cystine est alors convertie en L-
cysteine monohydrochloride en utilisant un procédé d'électrolyse.

La DL-cystéine monohydrochloride peut être produite par le procédé de
Strecker (réaction de la L-cystine en présence d'ammonium, d'HCN et de
mercaptaldehyde).

20 La réaction de Bucherer-Berg, dans laquelle sont mis en présence du
chloroacetaldehyde, de l'HCN, du bicarbonate d'ammonium et du sulfide de sodium,
permet aussi de produire de la L-cystéine. La L-cystéine étant alors cristallisée sous
sa forme monohydrochloride par réaction dans une solution d'acide chlorhydrique.

La production de la cystéine par voie enzymatique ou par bioconversion en
25 utilisant la tryptophane synthase pour catalyser la réaction entre une alanine
substituée en position bêta et un sulfide a été décrite dans les demandes de brevet GB
2 174 390 et EP 0 272 365. De même, la production de cystéine par fermentation de
microorganismes a été décrite dans les demandes de brevet EP 0 885 962, WO
01/27 307 et WO 97/15 673 qui décrivent respectivement une optimisation de
30 l'excrétion de la cystéine synthétisée par les microorganismes, la surexpression du
gène CysB pour optimiser la production d'H₂S, et une serine acétyl transferase
insensible à la rétro-inhibition par la cystéine.

La présente invention se rapporte à des souches de microorganismes modifiés en particulier des bactéries, notamment *E. coli* et les corynébactéries, produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)propionique de formule générale (I)



- 5 dans laquelle R représente un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 18 atomes de carbones, éventuellement substitué par un ou des groupse hydroxy, ou un radical aryle ou hétéroaryle comprenant un ou plusieurs atomes d'azote ou de soufre dans le cycle hétéroaromatique, sélectionné parmi les groupes phényle, pyridyle, pyrölyle, pyrazölyle, triazolyle, tetrazölyle, thiazölyle, ou thienyle,
- 10 par métabolisme d'une source de carbone simple et d'une source de soufre comprenant un composé de formule générale (II) :



- dans laquelle R' représente un atome d'hydrogène ou R, R étant défini précédemment, et ses sels physiologiquement acceptables,
- 15 lesdites souches présentant au moins un gène codant pour une enzyme mutée à activité « cystéine synthase modifiée ».

- Par sel physiologiquement acceptable, on entend selon l'invention les sels du composé de formule générale (I) qui n'affectent pas le métabolisme et la capacité de croissance de la souche de microorganisme selon l'invention, notamment les sels de
- 20 métaux alcalins comme le sodium.

- Par source de carbone simple, selon la présente invention, on entend des sources de carbone utilisables par l'homme du métier pour la croissance normale d'un microorganisme, d'une bactérie en particulier. On entend désigner notamment les différents sucres assimilables, tels le glucose, le galactose, le saccharose, le
- 25 lactose ou les mélasses, ou les sous-produits de ces sucres. Une source de carbone simple tout particulièrement préférée est le glucose. Une autre source de carbone simple préférée est le saccharose.

- Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, R représente un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 4 atomes de carbone, en
- 30 particulier choisi parmi les radicaux méthyle, éthyle, n-propyle, i-propyle, n-butyle, i-butyle ou t-butyle. De manière plus préférentielle, R représente le radical méthyle.

L'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)propionique de formule générale (I) obtenu est de préférence la L-cystéine.

Par enzyme à activité «cystéine synthase modifiée», on entend selon l'invention toute enzyme mutée impliquée dans la biosynthèse de l'acide aminé de formule générale (I), en particulier de la L-cystéine dont l'activité essentielle consiste à effectuer la conversion directe d'une acétylsérine, de préférence de la O-acétyl-L-sérine en acide aminé de formule générale (I) en présence de composé soufré de formule générale (II), l'activité essentielle de l'enzyme initiale non mutée n'étant pas une activité «cystéine synthase». Les enzymes naturellement impliquées dans la biosynthèse de la cystéine par conversion directe de la O-acétyl-L-sérine (acétylsérine) en L-cystéine en présence de sulfure d'hydrogène (H₂S), comme les cystéine synthases A ou B, codées par les gènes *cysK* ou *CysM*, respectivement, sont exclues de cette définition.

De manière préférentielle, l'enzyme «initiale» non mutée est une enzyme catalysant une réaction de sulfhydrylation en présence d'H₂S, de préférence une enzyme à activité O-acyl-L-homosérine sulfhydrolase.

De manière avantageuse, les enzymes «initiales» à activité O-acyl-L-homosérine sulfhydrolases sont choisies parmi les O-acyl-L-homosérine sulfhydrolases correspondant au PFAM référence PF01053 et au COG référence COG2873.

Les PFAM (Protein families database of alignments and Hidden Markov Models ; <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) représentent une large collection d'alignements de séquences protéiques. Chaque PFAM permet de visualiser des alignements multiples, de voir des domaines protéiques, d'évaluer la répartition entre les organismes, d'avoir accès à d'autres bases de données, de visualiser des structures connues de protéines.

Les COGs (Clusters of Orthologous Groups of proteins ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) sont obtenus en comparant les séquences protéiques issus de 43 génomes complètement séquencés représentant 30 lignées phylogénétiques majeurs. Chaque COG est défini à partir d'au moins trois lignées ce qui permet ainsi d'identifier des domaines conservés anciens.

Elles sont de préférence choisies parmi les acylhomosérine sulfhydrolases suivantes :

NP_785969 O-acetylhomoserine (thiol)-lyase, *Lactobacillus plantarum* WCFS1
 AAN68137 O-acetylhomoserine sulfhydrolase, *Pseudomonas putida* KT2440

- NP_599886 O-acetylhomoserine sulphydrylase, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032
- NP_712243 acetylhomoserine sulphydrylase, *Leptospira interrogans* serovar lai str. 56601
- 5 BAC46370 O-succinylhomoserine sulphydrylase, *Bradyrhizobium japonicum* USDA110
- AAO57279 O-succinylhomoserine sulphydrylase, *Pseudomonas syringae* pv. tomato str. DC3000
- NP_284520 O-succinylhomoserine sulphydrylase [*Neisseria meningitidis* Z2491
- 10 AAA83435 O-succinylhomoserine sulphydrylase (*P. aeruginosa*)

L'O-acyl-L-homosérine sulphydrylase est plus préférentiellement choisie parmi les O-acyl-L-homosérine sulphydrylase codées par le gène *metY* de *Corynebacterium*, en particulier le gène *metY* de *C. glutamicum* (Genbank AF220150), et les enzymes homologues présentant la même activité O-acyl-L-homosérine sulphydrylase, et au moins 80% d'homologie de séquence avec l'O-acyl-L-homosérine sulphydrylase codée par le gène *metY* de *C. glutamicum* (Genbank AF220150), préférentiellement au moins 85 % d'homologie, plus préférentiellement au moins 90 % d'homologie.

15

Les moyens d'identification des séquences homologues et de leur pourcentages d'homologie sont bien connus de l'homme du métier, comprenant notamment le programme BLAST, et notamment le programme BLASTP, qui peut être utilisé à partir du site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> avec les paramètres indiqués par défaut sur ce site.

20

L'invention est basée notamment sur le fait que l'on peut obtenir, de façon dirigée, une modification de la spécificité de substrat de l'enzyme acyl-homosérine sulphydrylase afin qu'elle utilise préférentiellement l'acétylsérine. En conséquence l'invention est basée sur le fait que l'on peut modifier de façon dirigée la spécificité de substrat de l'enzyme non modifiée afin d'évoluer d'une activité acylhomoserine sulphydrylase à une activité cystéine synthase.

25

Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, les souches de microorganismes non modifiés ne possèdent pas naturellement d'activité O-acyl-L-homosérine sulphydrylase ou ne possédant pas de gène homologue au gène *metY* codant pour cette enzyme.

30

On introduit alors dans les bactéries à modifier un gène codant pour une enzyme catalysant une réaction de sulfhydrylation en présence d'H₂S, telle que définie précédemment, à l'exclusion des enzymes dont l'activité principale est une activité cystéine synthase (aussi dénommée O-acétylsérine sulfhydrolase), en particulier un gène codant pour une O-acyl-L-homosérine sulfhydrolase, comme le gène metY de *Corynebacterium*, en particulier le gène metY de *C. glutamicum* (Genbank AF220150).

Le gène codant pour une enzyme catalysant une réaction de sulfhydrylation en présence d'H₂S peut-être introduit dans la bactérie à modifier selon les techniques usuelles à la disposition de l'homme du métier, soit par intégration directe dans le génome, soit porté par un plasmide réplcatif.

La transformation de l'activité acyl-homosérine sulfhydrylase en activité « cystéine synthase modifiée » sera réputée acquise lorsque la souche bactérienne génétiquement modifiée puis évoluée par sélection dirigée (A) aura une vitesse de croissance au moins similaire à celle de la souche sauvage (I) initiale lorsque cultivée dans un milieu minimum en présence de glucose pour seule source de carbone. Dans un mode particulier on considérera la transformation de l'activité acyl-homosérine sulfhydrylase en activité « cystéine synthase modifiée » sera réputée acquise lorsque l'activité cystéine synthase portée par la protéine O-acyl-L-homosérine sulfhydrolase modifiée sera améliorée de 10% par rapport à son activité initiale. Enfin cette transformation de l'activité acyl-homosérine sulfhydrylase en activité « cysteine synthase modifiée » sera réputée acquise lorsque la souche (A) produira au moins autant de cystéine que la souche (I) dans des condition de culture équivalentes, ne contenant pas de cystéine initialement.

La souche ainsi construite est de préférence sélectionnée et améliorée par un procédé de criblage et d'évolution, qui est aussi un objet de l'invention.

Les souches selon l'invention peuvent également être génétiquement modifiées par inactivation, mutation et/ou suractivation d'au moins un gène endogène, la modification étant effectuée préalablement ou non à la mise en œuvre avant la modification de leur activité cystéine synthase. En particulier, les souches de microorganismes selon l'invention sont génétiquement modifiées afin de supprimer les gènes cysK et/ou cysM et/ou metB, codant les protéines portant respectivement

les activités enzymatiques cystéine synthase A, cystéine synthase B et cystathionine gamma synthase. De manière préférentielle, les gènes *cysK* et *cysM* sont supprimés.

On peut le cas échéant supprimer le gène codant l'activité cystathionine gamma-lyase.

5 Le gène *cysK* code la cysteine synthaseA (GenBank NP_416909) et le gènes *cysM* code la cysteine synthase B (GenBank NP_416916). L'inactivation de ces gènes revient à supprimer les voies de biosynthèse de la cystéine et donc à rendre la souche auxotrophe pour la cystéine. Ceci permet de sélectionner les souches qui ont modifié l'activité acyl-homoserine sylfhydrylase en activité cystéine synthase afin de
10 restaurer la production de cystéine.

En utilisant les références données sur GenBank pour ces gènes qui sont bien connues, l'homme du métier est capable de déterminer les gènes équivalents dans d'autres souches bactériennes qu'*E. coli*. Ce travail de routine est avantageusement effectué en utilisant les séquences consensus pouvant être déterminées du fait de la
15 synthèse de ces gènes pour d'autres microorganismes, et en dessinant des sondes dégénérées permettant de cloner le gène correspondant dans un autre organisme. Ces techniques de routine de biologie moléculaire sont bien connues dans l'art et sont décrites par exemple dans Sambrook et al. (1989 Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.).

20 Dans un mode de réalisation, ladite souche bactérienne peut comprendre également une modification de l'activité sérine O-acyltransférase porté par le gène *cysE* afin de lui conférer une insensibilité à la rétro-inhibition par la cystéine.

Dans un autre mode de réalisation, ladite souche bactérienne peut comprendre également une surexpression du gène *cysB* afin de déréguler la voie d'assimilation
25 du soufre en H₂S.

Il peut-être également avantageux pour la production d'acides aminés de formule (I), de préférence de la L-cysteine, de surexprimer le gène codant l'acetyl-CoA synthetase, comme le gène *acs* (EC 6.2.1.1), ayant le numéro d'accension AE000480, en même temps que le gène codant pour une enzyme à activité « cystéine
30 synthase modifiée » défini précédemment.

Il peut également être avantageux d'atténuer, voire de supprimer les gènes codant pour une acétate kinase et/ou pour une phosphotransacetylase, notamment les gènes *ack* et *pta* ayant respectivement les numéros d'accension AE000318 et

AE000319, et codant respectivement une acétate kinase (EC 2.7.2.1) et une phosphotransacetylase (EC 2.3.1.8). Cette atténuation/suppression est de préférence combinée à une surexpression du gène codant l'acetyl-CoA synthetase.

Toutes les modifications mentionnées ci-dessus peuvent être effectuées
 5 directement sur la souche initiale. Alternativement, il peut être préférable de préparer une souche à activité « cystéine synthase modifiée » selon l'invention ne présentant qu'un nombre restreint de modifications, notamment en mettant en œuvre le procédé de criblage selon l'invention, avant d'effectuer d'autres modifications telles que mentionnées, afin d'augmenter la synthèse de l'acide aminé de formule (I) en
 10 particulier la L-cystéine.

L'homme du métier connaît les protocoles permettant de modifier le caractère génétique de microorganismes. La surexpression d'un gène peut être effectuée par changement du promoteur de ce gène *in situ*, par un promoteur fort ou inducible. De façon alternative, on introduit, dans la cellule, un plasmide réplcatif (simple ou
 15 multicopies) dans lequel le gène que l'on désire surexprimer est sous le contrôle du promoteur adéquat.

L'inactivation d'un gène se fait préférentiellement par recombinaison homologue. Le principe d'un protocole en est rappelé brièvement : on introduit dans la cellule un fragment linéaire, obtenu *in vitro*, comprenant les deux régions
 20 flanquant le gène, et au moins un gène de sélection entre ces deux régions (généralement un gène de résistance à un antibiotique), ledit fragment linéaire présentant donc un gène inactivé. On sélectionne les cellules ayant subi un événement de recombinaison et ayant intégré le fragment introduit par étalement sur milieu sélectif. On sélectionne ensuite les cellules ayant subi un événement de double
 25 recombinaison, dans lesquelles le gène natif a été remplacé par le gène inactivé. Ce protocole peut être amélioré en utilisant des systèmes de sélections positive et négative, afin d'accélérer la détection des événements de double recombinaison.

Dans un mode de réalisation préféré, ladite souche bactérienne est une souche d'*E. coli*.

30 Dans un autre mode de réalisation, ladite souche bactérienne est une souche de *Corynebacterium*, en particulier *C. glutamicum*.

L'invention concerne donc également un procédé de préparation d'une souche bactérienne à activité « cystéine synthase modifiée » telle que définie précédemment, ledit procédé comprenant une étape consistant cultiver sous pression de sélection dans un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple et une souche bactérienne comprenant une enzyme catalysant une réaction de sulfhydrylation en présence d'H₂S dont l'activité essentielle n'est pas une activité « cystéine synthase » telle que définie précédemment, afin de diriger une évolution du gène codant pour ladite enzyme dans ladite souche bactérienne, vers un gène codant pour une activité « cystéine synthase modifiée ».

Selon l'invention, les termes « culture » et « fermentation » sont employés indifféremment pour désigner la croissance de la bactérie sur un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple.

De manière préférentielle et afin d'accélérer la sélection et l'évolution dirigée du gène codant pour l'enzyme catalysant une réaction de sulfhydrylation en présence d'H₂S, on peut effectuer les opérations suivantes :

a. Coupler la biosynthèse de la cystéine à la croissance du microorganisme de telle sorte que la production de cystéine soit nécessaire à une bonne croissance du microorganisme

Pour cette raison on peut faire le choix de déléter les gènes *cysK*, *cysM* et éventuellement *metB* et éventuellement le gène codant une activité cystationine gamma lyase (e.g. gène *yrhB* chez *B. subtilis*), afin de supprimer toutes voies de synthèse naturelle de cystéine. Ce faisant la souche devient auxotrophe pour la cystéine.

Le microorganisme, pour vivre en milieu minimum contenant une source de carbone simple, doit donc optimiser l'activité cystéine synthase de l'O-acyl-L-homoserine sulfhydrylase, afin de rétablir la voie de synthèse de la cystéine à partir de d'acetylserine et d'H₂S. Lorsque la délétion *metB* est réalisée il peut être nécessaire de supplémenter le milieu en méthionine.

b. Supprimer les régulations, notamment les rétro-inhibitions soit au niveau des enzymes, soit au niveau des gènes afin que la voie de biosynthèse principale soit potentialisée

On peut ainsi surexprimer le gène *cysB* codant une protéine activatrice de la voie d'assimilation du soufre ([WO0127307](#)), permettant ainsi l'optimisation de la

production en H₂S. Par ailleurs, il a été montré que la serine acetyl-transferase, codée par le gène *cysE*, était rétro-inhibée par la cystéine. Il est donc souhaitable de remplacer cette enzyme par une enzyme insensible à la rétro-inhibition (WO9715673 ; WO02061106) ou bien de surexprimer l'enzyme (WO0229029).

- 5 Les techniques permettant l'expression ou la surexpression de gènes d'intérêt dans les bactéries sont bien connues de l'homme du métier. Les promoteurs, notamment les promoteurs forts, constitutifs chez les microorganismes sont également bien connus, de préférence choisi parmi pTAC-O, pLAC-O, pTRC-O et pTHLA, promoteurs forts pour lesquels l'opérateur a été délété pour les rendre
- 10 constitutifs.

L'invention se rapporte également à un procédé de préparation de cystéine, dans lequel on cultive un microorganisme à activité « cystéine synthase modifiée » tel que défini précédemment dans un milieu de culture approprié, ledit milieu

15 approprié comprenant une source de carbone simple telle que définie précédemment.

La définition des conditions de fermentation est du ressort de l'homme du métier. On fermente notamment les bactéries à une température comprise entre 20°C et 55°C, de préférence entre 25°C et 40°C, plus particulièrement d'environ 30°C pour *C. glutamicum* et d'environ 37°C pour *E. coli*.

- 20 La fermentation est conduite en fermenteurs avec un milieu minéral de culture de composition connu défini et adapté en fonction des bactéries utilisées, contenant au moins une source de carbone simple.

En particulier, le milieu minéral de culture pour *E. coli* pourra ainsi être de composition identique ou similaire à un milieu M9 (Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32:120-128), un milieu M63 (Miller, 1992 ; A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) ou un milieu tel que défini par Schaefer *et al.* (1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96).

- 30 De manière analogue, le milieu minéral de culture pour *C. glutamicum* pourra ainsi être de composition identique ou similaire au milieu BMCG (Liebl *et al.*, 1989, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 205-210) à un milieu tel que défini par Riedel *et al.* (2001, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 573-583).

Les milieux peuvent être supplémentés pour compenser les auxotrophies ; ils contiennent une concentration en carbone simple adaptée en fonction du mode de culture et de production, ainsi que du composé soufré de formule (II) en concentration adaptée en fonction de l'évolution de la souche et du mode de production retenu.

Après fermentation, la cystéine est récupérée selon les méthodes usuelles, et le cas échéant, purifiée.

Les techniques de récupération puis de purification de la cystéine dans les milieux de culture sont bien connues de l'homme du métier.

La présente invention concerne aussi un procédé de préparation d'un acide aminé de formule générale (I) tel que défini précédemment, caractérisé en ce que l'on fait réagir de l'acétylsérine avec une enzyme à activité « cystéine synthase modifiée » telle que définie précédemment, dans un milieu réactionnel approprié comprenant un composé soufré de formule générale (II) défini précédemment.

Le milieu réactionnel approprié est un milieu usuel de réaction enzymatique, bien connu de l'homme du métier, en particulier un milieu aqueux dans lequel les substrats et l'enzyme sont en solution ou en suspension. Les conditions de mise en œuvre de la réaction sont bien connues de l'homme du métier, afin notamment d'éviter une dénaturation substantielle de l'enzyme.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'enzyme à activité « cystéine synthase modifiée » est présente dans une bactérie inactivée ou dans un extrait cellulaire.

25

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1 : synthèse de la cystéine à partir de la sérine, chez les bactéries.

Figure 2 : stratégie pour obtenir une synthèse de cystéine à partir d' O-acetyl-L-sérine. La flèche rouge correspond à l'activité cystéine synthase portée par l'enzyme codée par le gène metY évolué selon l'invention (metY*).

30

EXEMPLES

Exemple 1 : construction de la souche E. coli K12 Δ (cysK, cysM)

L'inactivation des gènes *cysK* et *cysM* est réalisée en insérant une cassette de résistance à un antibiotique (chloramphénicol et kanamycine respectivement) tout en délétant la majeure partie des gènes concernés. La technique utilisée est décrite par Datsenko, K.A. ; Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 : 6640-6645. Pour chaque construction un couple d'oligonucléotide a été synthétisé :

Pour *cysK* :

DcysKR de 100 bases (SEQ ID NO 1) :

TgttgcaatttttctcagtgaagagatcggcaacaatgcggtgcttaataacgctcaccgatgatggtagaataacC
10 ATATGAATATCCTCCTTAG

avec

- une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (2531396 à 2531317) du gène *cysK* (séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)
- 15 - une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance au chloramphénicol (séquence de référence dans la publication Datsenko, K.A. et Wanner, B.L., 2000, PNAS, 97 : 6640-6645)

DcysKF de 100 bases (SEQ ID NO 2) :

agtaagattttgaagataactcgctgactatcggtcacacgccgctggctgcctgaatcgcatcggtaacggacgcatT
20 GTAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec :

- une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (2530432 à 2530511) du gène *cysK*
- une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de
- 25 résistance au chloramphénicol.

Pour *cysM* :

DcysMR de 100 bases (SEQ ID NO 3) :

ccgccccctggctaaaatgctcttcccaaacaccccggtagaaaggtagcgcgcacgatgcagatgatcgcca
cCATATGAATATCCTCCTTAG

30 avec :

- une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (2536699 à 2536778) du gène *cysM* (séquence de référence sur le site <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>)

- une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance à la kanamycine

DcysMF de 100 bases (SEQ ID NO 4):

5 Agtācattagaacaacaataggcaatacgcctctgtgaagttgcagcgaatggggccggataacggcagtgaaagtgt
gTG TAGGCTGGAGCTGCTTCG

avec :

- une région (caractères minuscules) homologue à la séquence (2537600 à 2537521) du gène *cysM*
- une région (caractères majuscules) pour l'amplification de la cassette de résistance à la kanamycine

10 Les oligonucléotides DcysKR et DcysKF d'une part et DcysMR et DcysMF d'autre part, sont utilisés pour amplifier respectivement la cassette de résistance au chloramphénicol et à la kanamycine à partir des plasmides pKD3 et pKD4. Le produit PCR obtenu est alors introduit par électroporation dans la souche MG1655
15 (pKD46) dans laquelle l'enzyme Red recombinase exprimée permet la recombinaison homologue. Les transformants résistants à chacun des antibiotiques sont alors sélectionnés et l'insertion de la cassette de résistance est vérifiée par une analyse PCR avec les oligonucléotides *cysKR* et *cysKF* d'une part et *cysMR* et *cysMF* d'autre part.

20 *cyKR* (SEQ ID NO 5) : ttttaacagacgcgacgcacgaagagcgc (homologue à la séquence de 2531698 à 2531669)

cysKF (SEQ ID NO 6) : ggcgcgacggcgatgtgggtcgattgctat (homologue à la séquence de 2530188 à 2530217)

25 *cysMR* (SEQ ID NO 7) : ggggtgacggtcaggactcaccaatacttc (homologue à la séquence de 2536430 à 2536459)

cysMF (SEQ ID NO 8) : ggcgcgcatcgctggccgctgggtacacac (homologue à la séquence de 2538071 à 2538042)

30 Les cassettes de résistance au chloramphénicol et à la kanamycine peuvent ensuite être éliminées. Pour cela, Le plasmide pCP20 porteur de la recombinaison FLP agissant au niveau des sites FRT de la cassette de résistance au chloramphénicol ou à la kanamycine, est introduit dans les souches recombinantes par électroporation. Après une série de cultures à 42°C, la perte de la cassette de résistance à

l'antibiotique est vérifiée par une analyse PCR avec les mêmes oligonucléotides que ceux utilisés précédemment.

Exemple 2 : introduction du gène metY dans la souche précédente

5 Le plasmide pTopometY a été construit par insertion du gène metY dans le vecteur Zero Blunt TOPO PCR cloning kit for sequencing (PCR4 TOPO vector, Invitrogen). Pour cela, le gène metY a été amplifié par PCR avec la polymérase Pwo à partir de l'ADN chromosomique de la souche *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 en utilisant les oligonucléotides suivants :

10 MetYR (SEQ ID NO 9) :

ttagagctgttgacaattaatcatccggctcgtataatgtgtggaataaaaactcttaaggacctccaaatgcc

Promoteur de type TRC (pTRC-O) en gras et noir, RBS du gène metY en gras et souligné, codon d'initiation du gène metY en gras et italiques.

MetYF (SEQ ID NO 10) :

15 gctctgtctagtctagttgcattctcag

Séquence choisie en aval du terminateur de transcription du gène metY.

Le produit PCR obtenu est ensuite directement cloné dans le vecteur Topo pour donner le plasmide pTopometY. Le vecteur Topo porte une origine de réplication pour *E. coli*, un gène de résistance à l'ampicilline et un gène de résistance à la kanamycine.

20 Le plasmide pTopometY est alors introduit dans la souche *E. coli* DH5α pour vérification de la construction. Le séquençage du gène metY du plasmide pTopometY avec les oligonucléotides universels M13 reverse et M13 forward sera ensuite réalisé pour confirmer la construction.

25 Le plasmide est introduit dans la souche *E. coli* Δ(cysK, cysM) (exemple 1) par électroporation.

Exemple 3 : sélection dirigée de la souche afin de faire évoluer le gène metY codant l'activité acetyl-homoserine sulfhydrylase vers une activité cysteine synthase.

30 La sélection dirigée de la souche précédente contenant le gène metY peut-être réalisée en flacons ou en Erlen-Meyer. La mise en œuvre de cette technique permet la sélection d'une souche de *Escherichia coli* dont l'enzyme acetyl-homosérine

sulphydrolase a évolué en une activité « cystéine synthase ». La sélection dirigée est conduite en Erlen-Meyer contenant 50 mL de milieu minéral (Schaefer et al., 1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-96) en présence de 33 mM glucose, de chloramphénicol à une concentration finale de 25 mg/l et de kanamycine à une concentration de 25 mg/ml

Les milieux de culture sontensemencés avec la souche *E. coli* K12 [Δ (*cysK*, *cysM*) pTopometY] à DO_{600nm} définie. On ensemence avec une population de bactéries suffisamment importante pour que certaines bactéries possèdent potentiellement des mutations spontanées intéressantes dans le gène *metY*, permettant d'assimiler l'O-acetyl serine. Cette population a été obtenue par culture de la souche auxotrophe en cystéine sur milieu minimum supplémenté en cystéine. Une culture témoin est ensemencée avec la souche *E. coli* K12 (Δ *cysK*, *cysM*).

Les cultures sont réalisées sous agitation, à 37°C, pendant 6 jours, puis la DO_{600nm} est mesurée. La culture témoin ne présente pratiquement pas d'évolution de DO alors que quelques autres cultures ont vu leur DO évoluer de manière significative. Il est probable que l'activité « cystéine synthase modifiée » se soit développée dans les populations contenues dans ces Erlen-Meyer. La ou les mutations sont vraisemblablement intervenue dans le gène *metY* puisque c'est la seule différence entre ces souches et la souche témoin.

La population bactérienne de ces cultures positives peut alors être utilisée pour améliorer davantage l'activité cystéine synthase, soit en utilisant un procédé de criblage et amélioration par fermentation en étage (exemple 4) ou en recommençant le procédé en flacon tel qu'il vient d'être décrit.

Exemple 4 : sélection dirigée de la souche afin de faire évoluer le gène *metY* codant l'activité acetyl-homoserine sulphydrylase vers une activité cystéine synthase.

La population précédente *E. coli*K12 est introduite dans un système en continu en étage afin de poursuivre la sélection dirigée

Le premier fermenteur produit les bactéries à une vitesse proche du taux de croissance maximum (milieu minimum avec environ 10 μ M de cystéine). Les bactéries passent en continu de ce fermenteur dans un second fermenteur caractérisé

par un taux de dilution plus faible et un milieu avec le crible de sélection (ici, milieu minimal avec glucose pour seule source de carbone).

La pression de sélection, imposée à la bactérie dans le second fermenteur, est établie par l'absence de cystéine. Des cycles successifs de sélection permettent
5 d'appliquer aux bactéries des cribles de plus en plus fort par des concentrations décroissantes en cystéine dans le fermenteur initial.

Pour chaque concentration, la souche sélectionnée dans le second fermenteur est celle qui présente le meilleur taux de croissance en utilisant du glucose pour seule source de carbone.

10 On effectue différents cycles de sélection pour obtenir une souche fermentant le glucose dans un milieu minimum avec une vitesse élevée. L'analyse de cette souche permet de définir les mutations dans le gène *metY*.

Exemple 5 : sélection des clones

15 La population optimisée est étalée alors sur milieu minimum gélosé contenant du glucose pour seule source de carbone. Les boîtes inoculées sont placées en condition aérobie dans un incubateur à 37°C. Après 36 heures, les clones apparaissent sur les boîtes ; ils correspondent aux bactéries capables de produire de la cystéine à partir du glucose pour seule source de carbone. Trois clones sont isolés et
20 le plasmide portant le gène *metY* isolé et ce gène séquencé.

Exemple 6 : contrôle de la voie de synthèse

La population d'*E. coli* K12 [Δ (*cysK*, *cysM*) pTopometY] optimisée est mise en culture dans un milieu minimum (Schaefer *et al.*, 1999, *Anal. Biochem.* 270 : 88-
25 96) contenant 2,5 g.l⁻¹ de glucose entièrement marqué au carbone 13. Après la culture, les cellules sont récupérées, lavées puis hydrolysées par HCl 6N pendant 24 heures à 107°C. Une analyse par RMN bidimensionnelle est alors réalisée (HSQC). Cette analyse permet d'étudier le flux des carbones 13 du glucose et confirmer que la
30 l'enzyme codée par le gène *metY* a effectivement évoluée en une cystéine synthase.

Revendications

1. Souche de microorganismes modifiés en particulier des bactéries, notamment *E. coli* et les corynébactéries, produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)propionique de formule générale (I)



dans laquelle R représente un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 18 atomes de carbones, éventuellement substitué par un ou groupe hydroxy, ou un radical aryle ou hétéroaryle comprenant un ou plusieurs atomes d'azote ou de soufre dans le cycle hétéroaromatique, sélectionné parmi les groupes phényle, pyridyle, pyrölyle, pyrazölyle, triazolyle, tetrazölyle, thiazölyle, ou thienyle,
10 par métabolisme d'une source de carbone simple et d'une source de soufre comprenant un composé de formule générale (II) :



dans laquelle R' représente un atome d'hydrogène ou R, R étant défini
15 précédemment, et ses sels physiologiquement acceptables,

lesdites souches présentant au moins une un gène codant pour une enzyme mutée à activité « cystéine synthase modifiée ».

2. Souche selon la revendication 1, caractérisée en ce que R représente un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 4 atomes de carbone.

20 3. Souche selon la revendication 2, caractérisée en ce que R représente le radical méthyle.

4. Souche selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)propionique de formule générale (I) obtenu est la L-cystéine.

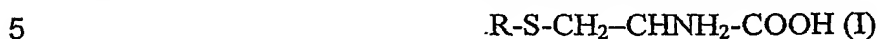
25 5. Souche selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'enzyme « initiale » non mutée est une enzyme catalysant une réaction de sulphydrylation en présence d'H₂S.

6. Souche selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'enzyme « initiale » non mutée est une enzyme à activité O-acyl-L-homosérine sulphydrolase.

30 7. Souche selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'enzyme « initiale » à activité O-acyl-L-homosérine sulphydrylases est choisies parmi les O-acyl-L-homosérine sulphydrylases correspondant au PFAM référence PF01053 et au COG référence COG2873.

Revendications

1. Souche de microorganismes modifiés en particulier des bactéries, notamment *E. coli* et les corynébactéries, produisant de l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)propionique de formule générale (I)



dans laquelle R représente un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 18 atomes de carbones, éventuellement substitué par un ou plusieurs groupes hydroxy, ou un radical aryle ou hétéroaryle comprenant un ou plusieurs atomes d'azote ou de soufre dans le cycle hétéroaromatique, sélectionné parmi les groupes
10 phényle, pyridyle, pyrrolyle, pyrazolyle, triazolyle, tetrazolyle, thiazolyle, ou thienyle, par métabolisme d'une source de carbone simple et d'une source de soufre comprenant un composé de formule générale (II) :



dans laquelle R' représente un atome d'hydrogène ou R, R étant défini
15 précédemment, et ses sels physiologiquement acceptables,

lesdites souches présentant au moins une un gène codant pour une enzyme mutée à activité « cystéine synthase modifiée ».

2. Souche selon la revendication 1, caractérisée en ce que R représente un radical alkyle linéaire ou ramifié comprenant de 1 à 4 atomes de carbone.

20 3. Souche selon la revendication 2, caractérisée en ce que R représente le radical méthyle.

4. Souche selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'acide 2-amino-4-(alkylmercapto)propionique de formule générale (I) obtenu est la L-cystéine.

25 5. Souche selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'enzyme « initiale » non mutée est une enzyme catalysant une réaction de sulphydrylation en présence d'H₂S.

6. Souche selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'enzyme « initiale » non mutée est une enzyme à activité O-acyl-L-homosérine sulphydrylase.

30 7. Souche selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'enzyme « initiale » à activité O-acyl-L-homosérine sulphydrylases est choisies parmi les O-acyl-L-homosérine sulphydrylases correspondant au PFAM référence PF01053 et au COG référence COG2873.

8. Souche selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'enzyme « initiale » est choisie parmi les acylhomosérine sulfhydrolases suivantes :

NP_785969 O-acetylhomoserine (thiol)-lyase, *Lactobacillus plantarum* WCFS1

AAN68137 O-acetylhomoserine sulfhydrolase, *Pseudomonas putida* KT2440

5 NP_599886 O-acetylhomoserine sulfhydrolase, *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

NP_712243 acetylhomoserine sulfhydrolase, *Leptospira interrogans* serovar lai str. 56601

10 BAC46370 O-succinylhomoserine sulfhydrolase, *Bradyrhizobium japonicum* USDA110

AAO57279 O-succinylhomoserine sulfhydrolase, *Pseudomonas syringae* pv. tomato str. DC3000

NP_284520 O-succinylhomoserine sulfhydrolase [*Neisseria meningitidis* Z2491

AAA83435 O-succinylhomoserine sulfhydrolase (*P. aeruginosa*)

15 9. Souche selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'enzyme « initiale » est l'O-acyl-L-homosérine sulfhydrolase codée par le gène metY de *Corynebacterium*.

10. Souche selon la revendication 9, caractérisée en ce que l'O-acyl-L-homosérine sulfhydrolase est codée par le gène metY de *C. glutamicum* (Genbank 20 AF220150).

11. Souche selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle est génétiquement modifiée afin de supprimer les gènes cysK et/ou cysM et/ou metB, codant les protéines portant respectivement les activités enzymatiques cystéine synthase A, cystéine synthase B et cystathionine gamma synthase.

25 12. Souche selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que le gène codant l'activité cystathionine gamma-lyase est atténué ou supprimé.

13. Souche selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que le gène codant l'acetyl-CoA synthetase est surexprimé.

14. Souche selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que 30 les gènes codant pour une acétate kinase et/ou une phosphotransacétylase sont atténués ou supprimés.

15. Procédé de préparation d'une souche bactérienne à activité « cystéine synthase modifiée » telle que définie dans les revendications 1 à 14, ledit procédé

comprenant une étape consistant cultiver sous pression de sélection dans un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple une souche bactérienne comprenant une enzyme catalysant une réaction de sulfhydrylation en présence d'H₂S dont l'activité essentielle n'est pas une activité « cystéine synthase »,

- 5 afin de diriger une évolution du gène codant pour ladite enzyme dans ladite souche bactérienne, vers un gène codant pour une activité « cystéine synthase modifiée ».

16. Procédé de préparation d'un acide aminé de formule générale (I) tel que défini dans l'une des revendications 1 à 4, dans lequel on cultive un microorganisme à activité « cystéine synthase modifiée » tel que défini dans les
10 revendications 1 à 14 dans un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple et un dérivé soufré de formule générale (II) tel que défini dans l'une des revendications 1 à 3, l'acide aminé de formule (I) étant récupéré et, le cas échéant, purifié.

17. Procédé de préparation d'un acide aminé de formule générale (I) tel que défini dans l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'on fait réagir
15 de l'acétylsérine avec une enzyme à activité « cystéine synthase modifiée » telle que définie dans l'une des revendications 1 à 10, dans un milieu réactionnel approprié comprenant un composé soufré de formule générale (II) défini dans l'une des revendications 1 à 7.

- 20 18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'enzyme à activité « cystéine synthase modifiée » est présente dans une bactérie inactivée ou dans un extrait cellulaire.

comprenant une étape consistant cultiver sous pression de sélection dans un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple une souche bactérienne comprenant une enzyme catalysant une réaction de sulfhydrylation en présence d' H_2S dont l'activité essentielle n'est pas une activité « cystéine synthase »,
5 afin de diriger une évolution du gène codant pour ladite enzyme dans ladite souche bactérienne, vers un gène codant pour une activité « cystéine synthase modifiée ».

16. Procédé de préparation d'un acide aminé de formule générale (I) tel que défini dans l'une des revendications 1 à 4, dans lequel on cultive un microorganisme à activité « cystéine synthase modifiée » tel que défini dans les
10 revendications 1 à 14 dans un milieu de culture approprié comprenant une source de carbone simple et un dérivé soufré de formule générale (II) tel que défini dans l'une des revendications 1 à 3, l'acide aminé de formule (I) étant récupéré et, le cas échéant, purifié.

17. Procédé de préparation d'un acide aminé de formule générale (I) tel que défini dans l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'on fait réagir de l'acétylsérine avec une enzyme à activité « cystéine synthase modifiée » telle que
15 définie dans l'une des revendications 1 à 10, dans un milieu réactionnel approprié comprenant un composé soufré de formule générale (II) défini dans l'une des revendications 1 à 3.

20 18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'enzyme à activité « cystéine synthase modifiée » est présente dans une bactérie inactivée ou dans un extrait cellulaire.

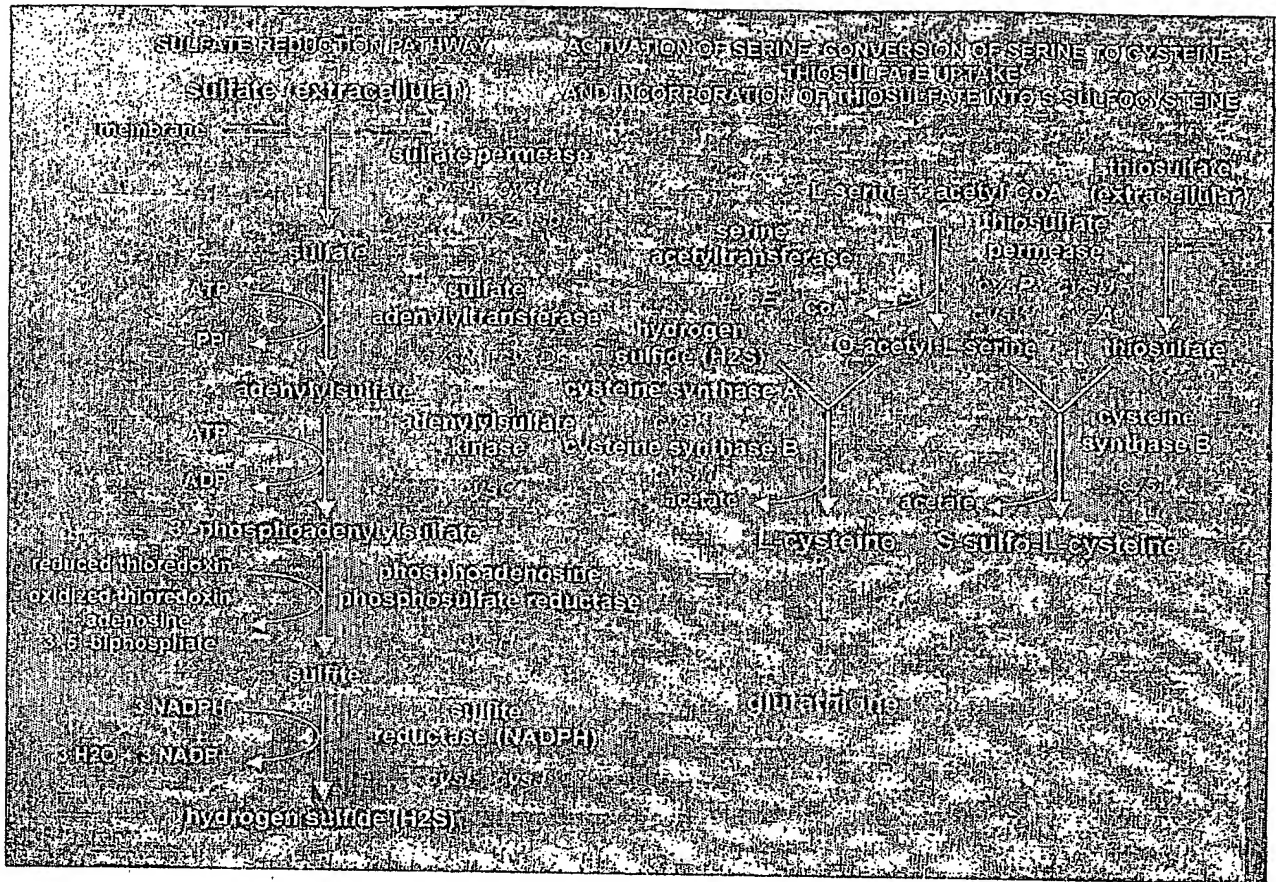


Figure 1

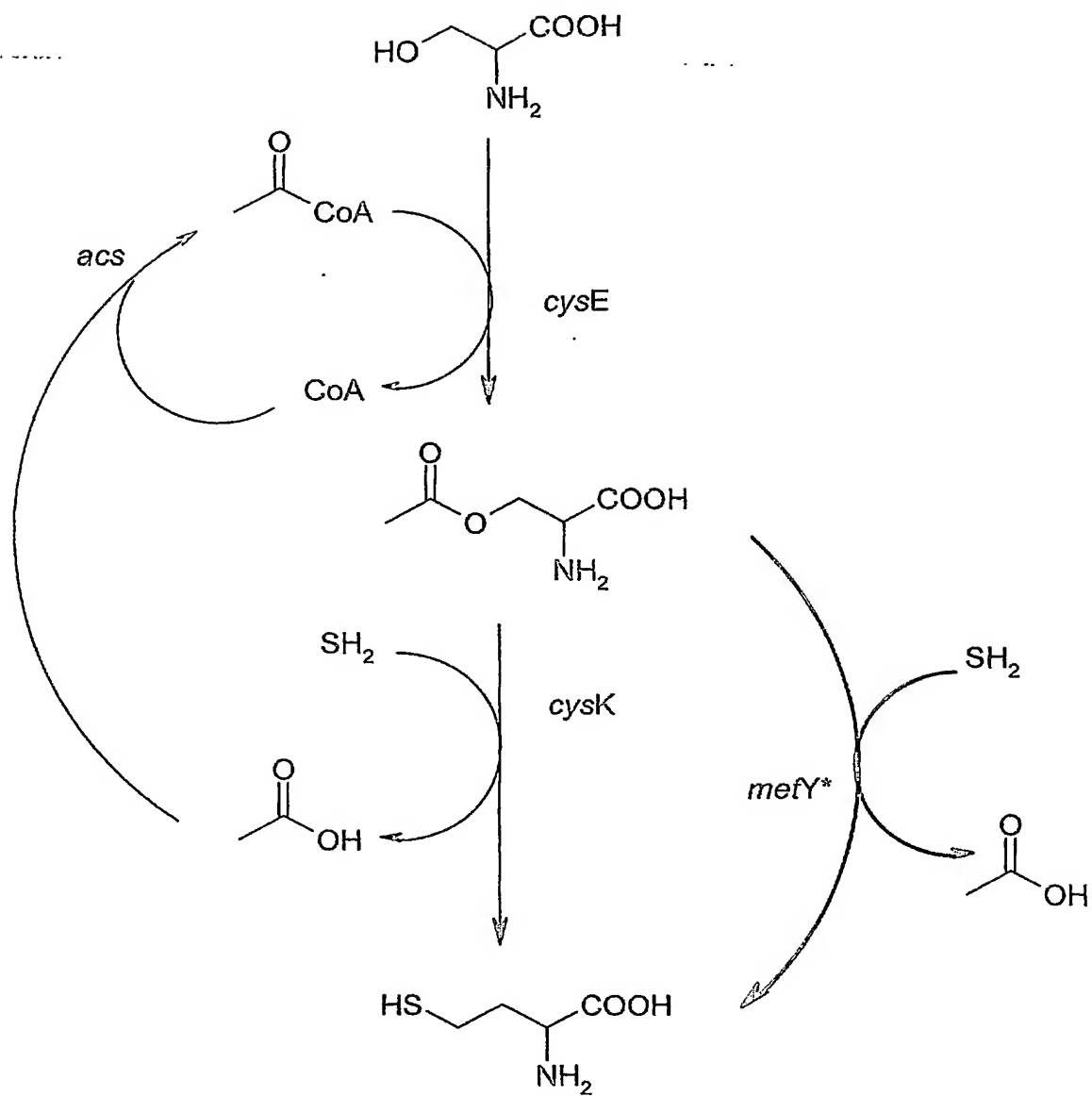


Figure 2

LISTE DE SEQUENCES

<110> Metabolic Explorer

<120> Microorganisme à activité cystéine synthase modifiée et procédé de préparation de la cystéine

<130> D21227

<160> 10

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 100

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide DcysKR

<400> 1

tgttgcaatt ctttctcagt gaagagatcg gcaaacaatg cggtgcttaa ataacgctca 60
cccgatgatg gtagaataac catatgaata tcctccttag 100

<210> 2

<211> 100

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide DcysKF

<400> 2

agtaagattt ttgaagataa ctcgctgact atcggtcaca cgccgctggt tgcgctgaat 60
cgcatcggtg acggacgcat tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 3

<211> 100

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide DcysMR

<400> 3

cccgccccct ggctaaaatg ctcttcacca aacaccccg tagaaaggta gcgatcgcca 60
cgatcgcaga tgatcgccac catatgaata tcctccttag 100

<210> 4

<211> 100

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide DcysMF

<400> 4

agtacattag aacaaacaat aggcaatacg cctctggtga agttgcagcg aatggggcgc 60
 gataacggca gtgaagtgtg tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 5
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Amorce PCR cysKR

<400> 5
 tttttaacag acgcgacgca cgaagagcgc 30

<210> 6
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Amorce PCR cysKF

<400> 6
 ggcgcgacgg cgatgtgggt cgattgctat 30

<210> 7
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Amorce PCR cysMR

<400> 7
 ggggtgacgg tcaggactca ccaatacttc 30

<210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Amorce PCR cysMF

<400> 8
 gcgcgcacgc ctggccgctg ggctacacac 30

<210> 9
 <211> 74
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Oligonucléotide MetYR

<400> 9

ttagagctgt tgacaattaa tcatccggt cgtataatgt gtggaataaa aactcttaag 60
gacctcaaaa tgcc 74

<210> 10

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Oligonucléotide MetYF

<400> 10

gctctgtcta gtctagtttg cattctcag

30

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

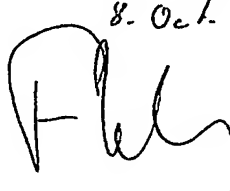
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ... 1

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

113 113 W / 260839

Vos références pour ce dossier (facultatif)		240569 D21227 FT
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0305769
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) MICROORGANISME A ACTIVITE CYSTEINE SYNTHASE MODIFIEE ET PROCEDE DE PREPARATION DE LA CYSTEINE.		
LE(S) DEMANDEUR(S) : METABOLIC EXPLORER ; BIOPOLE CLERMONT-LIMAGNE 63360 SAINT BEAUZIRE FRANCE - FRANCE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).		
Nom		
Prénoms		CHATEAU Michel
Adresse	Rue	Les Baumettes, Appt 47 - Bat E1
	Code postal et ville	63200 RIOM
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		
Prénoms		SOUCAILLE Philippe, Noel, Paul
Adresse	Rue	Chant du Coucou
	Code postal et ville	31450 DEYME
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		
Prénoms		ZINK Olivier
Adresse	Rue	1, Place du Sauvage
	Code postal et ville	63000 CLERMONT FERRAND
Société d'appartenance (facultatif)		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Franck TETAR Cpi 94 - 1103 8. Oct. 03 

FCT/FR2004/000354



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☒ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.